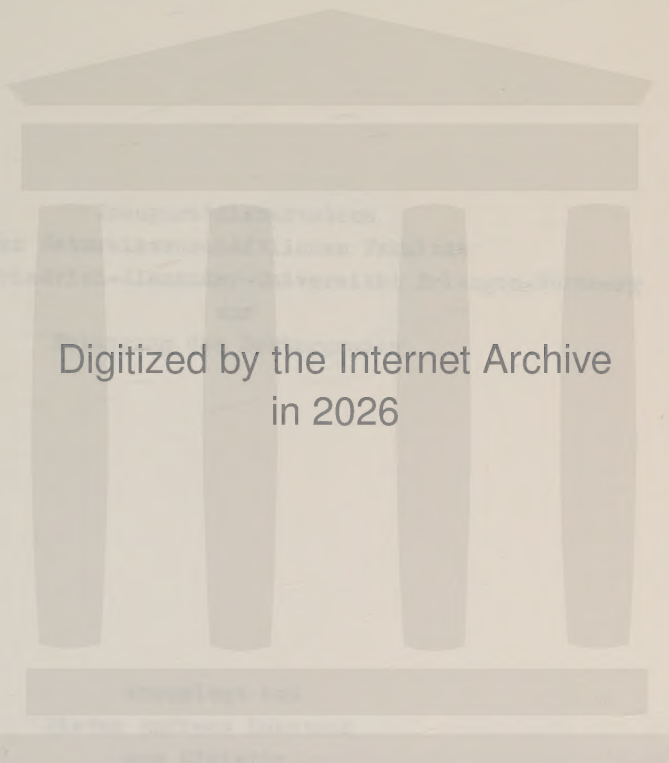


Antibiotisch wirksame Wassermyxobakterien
(*Sporocytophaga cauliformis*) und ihr Wirkstoff

von

Dieter Andreas Sukatsch
aus Gleiwitz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Antibiotisch wirksame Wassermixobakterien
(Sporocytophaga cauliformis) und ihr Wirkstoff

Inauguraldissertation
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Dieter Andreas Sukatsch
aus Gleiwitz

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung : 21.7.1965
Dekan : Universitätsprofessor Dr. Th. Ernst
Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. M. Knorr
Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. W. Haupt

Meiner Mutter gewidmet

Gliederung

I. Einleitung

II. Hauptteil

1. Der Anteil antibiotisch wirksamer Stämme bei *Sporocytophaga cauliformis*
2. Das antibiotische Spektrum von *Sporocytophaga cauliformis*
 - a) Wirksamkeit gegen Bakterien
 - b) Wirksamkeit gegen Protozoen
3. Isolierung und Reindarstellung des Antibiotikums von *Sporocytophaga cauliformis*
 - a) Lösungsversuche
 - b) Dialyse
 - c) Elektrophorese
 - d) Papierchromatographie
 - e) Säulenchromatographie

Verfahren, die zu einer kristallinen Form des Antibiotikums führten

- a) Acetonmethode
- b) Dialysemethode

4. Beschaffenheit des Antibiotikums

- a) Physikalische Eigenschaften
- b) Chemische Eigenschaften
- c) Biologische Eigenschaften

5. Diskussion

III. Zusammenfassung

IV. Schrifttum

Lebenslauf

I. Einleitung

Die Myxobakterien zählen aufgrund ihrer morphologischen und bewegungsphysiologischen Eigenarten zu den interessantesten Mikroorganismen. Sie waren daher seit ihrer ersten Beschreibung durch Thaxter (1892) immer wieder Gegenstand intensiver mikrobiologischer Forschung. Während die älteren Arbeiten hauptsächlich morphologisch-systematischer Art waren, rückten in neuerer Zeit vor allem physiologische Untersuchungen dieser Bakterienordnung in den Vordergrund. Die Hauptkennzeichen der Myxobakterien, die von Jahn 1911 zu einer eigenen Ordnung, bestehend aus 5 Familien, zusammengefaßt worden waren, sind:

- 1.) Kriechend-gleitende Fortbewegung auf festen Unterlagen bei Fehlen eines Geißelapparates.
- 2.) Aktive Flexibilität der meist fadenförmigen Keime.
- 3.) Das Vorliegen eines charakteristischen Lebenszyklus, in dessen Verlauf die Keime zu schleimigen, meist pilzförmigen Fruchtkörpern zusammenkriechen und sich dann in zystenähnliche Dauerformen (Mikrozysten) umwandeln, aus denen sie zu gegebener Zeit wieder als vegetative Keime ausschlüpfen.
- 4.) Das häufige Vorhandensein sich vom Zellplasma distinkt abhebender Strukturen, die von den meisten Autoren als Kernäquivalente höherer Ordnung angesehen werden.

Über Vorkommen und Verbreitung der Myxobakterien existierte bis in jüngere Zeit die Vorstellung, daß sie ausgesprochene Bodenbakterien seien, die mittels ihres meist stark ausgeprägten Zellulosespaltungsvermögens eine wichtige Rolle im natürlichen Kreislauf der Stoffe spielen. Dementsprechend sind die meisten der bisher beschriebenen Myxobakterienarten aus Bodenproben, Mist von Pflanzenfressern, faulenden

Hölzern und abgefallenem Laub isoliert worden (Kühlwein). Erst in den letzten Jahren ist die Erkenntnis über die Ökologie der Myxobakterien wesentlich erweitert worden. So konnte Gräf (1962) sogar in der menschlichen Mundhöhle eine neue Myxobakterienart mit streng anaeroben Eigenschaften nachweisen und beschreiben.

Über das Vorkommen von Myxobakterien im Wasser fanden sich nur vereinzelte Angaben. So berichtete Geitler (1925) über eine fruchtkörperbildende Myxobakterienart (Polyangium parasiticum), die im Wasser an Chladophora-Algenfäden parasitierend anzutreffen sei. Wesentlich später erschien dann die Mitteilung von Ordal und Rucker (1944), daß gewisse Myxobakterien (Chondrococcus columnaris) als Fischparasiten eine endemische Erkrankung bei Lachsen verursachen.

In der Folgezeit wurden dann eine Reihe von halophilen Myxobakterien aus Meerwasserproben isoliert und beschrieben. Diese marinen Myxobakterien besitzen zum Teil agarzersetzende Eigenschaften und zeichnen sich u.a. durch fakultativ anaerobes Wachstum aus (Humm 1946; Starr und Ordal 1953; Bachmann 1955; Kadota 1956; Velankar 1957).

Erst 1961 konnten Anderson und Ordal aus Süßwasserproben eine fakultativ anaerobe Myxobakterienart (Cytophaga succinicans) züchten und biochemisch untersuchen.

Die Kenntnisse über Wassermyxobakterien fanden eine weitere Bereicherung, als Gräf (1962) zunächst aus Trinkwasserproben, dann aber aus allen Oberflächengewässern eine neue Wassermyxobakterienart Sporocytophaga cauliiformis als regelmäßigen Bestandteil der Gewässerbakterienflora ermitteln konnte. Diese neuen Wassermyxobakterien zeichnen sich durch stielförmige Fortsätze mit kleinen Endanschwellungen aus, wenn sie auf bestimmten Nährböden z.B. 2 %igem Hammelblutagar, kultiviert werden. Die morphologische Ähnlichkeit mit begeißelten, ge-

stielten Bakterien, den Caulobakterien einerseits, und das Bildungsvermögen von Mikrozysten ohne Fruchtkörperausbildung andererseits, veranlaßte Gräf, diese Keime in die Familie der Myxococcaceae unter das Genus Sporocytophaga als neue Spezies einzureihen.

Die Myxobakterienart Sporocytophaga cauliformis erwies sich im Verlauf weiterer Untersuchungen als regelmäßiger Bewohner praktisch aller Oberflächengewässer mit einer Beteiligung an der Gesamtkeimzahl von 2 - 3 % (Gräf und Stürzenhofecker). Die biochemische Untersuchung von 317 Stämmen dieser Wassergekeime aus dem Bodensee führte zu dem Ergebnis, daß sich die Spezies Sporocytophaga cauliformis in 2 Typen untergliedern läßt:

Zu Typ I gehören alle Stämme, die zuckerhaltige Nährböden zu säuern vermögen und gleichzeitig starke Katalasebildner sind. Typ II umfaßt dagegen alle die Stämme, die kein Zuckerspaltungsvermögen besitzen und auch nur mit schwacher Katalaseaktivität ausgestattet sind (Gräf und Stürzenhofecker).

Diese Typenunterscheidung auf biochemischer Basis fand, wie im Folgenden noch gezeigt wird, auch darin ihre Bestätigung, daß sich Typ II - Stämme von Sporocytophaga cauliformis als potentielle Antibiotikabildner erwiesen, während Typ I - Stämme diese antibiotischen Eigenschaften grundsätzlich vermissen ließen.

Das Vermögen, antibiotische Wirkstoffe zu produzieren, ist in systematischer Hinsicht über das ganze Bakterienreich verteilt. So nimmt es nicht Wunder, daß auch unter den Myxobakterien Antibiotikabildner nicht selten anzutreffen sind. Gerade bei den Myxobakterien scheint der Kampf ums Dasein, der Bakterienantagonismus, in besonderer Ausprägung zu bestehen. So ist von vielen im Boden lebenden Myxobakterienarten bekannt, daß sie die Antibiose nicht nur dazu benützen, sich

ihren Lebensraum gegenüber anderen Mikroorganismen "abzuschirmen", sondern daß sie ihre antibiotischen Stoffe sogar zur Nahrungsbeschaffung gebrauchen. In den Wirkungsbereich der Myxobakterien geratene Fremdbakterien werden durch das Antibiotikum abgetötet (Baktericidie) oder zumindest in ihrer Vitalität geschädigt (Bakteriostase) und dann auf ektofermentativem Wege durch proteolytische Fermente zur Auflösung gebracht (Singh und Oxford; Singh). Die Eigenschaften, durch kombinierte Anwendung antibiotischer Substanzen und lytischer Fermente lebende Mikroorganismen der Umwelt abzutöten und als Futterquelle zu verwenden, hat daher nicht zu Unrecht den Myxobakterien die Bezeichnung "Mikroräuber" eingebracht (Anscombe und Singh).

Die Aggressivität der Myxobakterien erstreckt sich auf Bakterien, Hefezellen, Algen, Phycomyceten und sogar auf manche Virusarten. (Bauer 1905; Jahn, E. 1924; Pinoy, M.E. 1913; Solntzewa 1939; Beebe, J.M. 1941; Sniesko, Mc. Allister und Hitchner 1943; Singh 1947; Imsenetzky und Kusjurina 1951; Norén 1952, 1953; Oetker 1953; Finck 1951; Oxford und Singh 1946; Kühlwein 1955; Katzberger, Kühlwein und Kausche 1956).

Während über die lytischen Vorgänge, die sich bei der Einwirkung von Myxobakterien auf Fremdkeime abspielen, ausführliche Arbeiten vorliegen (Bender; Norén), sind Untersuchungen über Wesen und Wirkung der antibiotischen Substanzen verhältnismäßig spärlich.

Als erster berichtete Oxford über ein antibiotikumproduzierendes Myxobakterium (Myxococcus virescens). Die antibiotische Wirkung war jedoch auf gram-positive Keime beschränkt. Auch eine Rohdarstellung der wirksamen Substanz gelang (Oxford und Singh).

Über bakterizide und fungizide Wirkungen einer Reihe von Myxococcusarten (M. rubescens, M. viperus, M. cerebriiformis,

M. breviceps und M. polycistus) gegen Luftkokken, Kurzstäbchen, Sporenbildner und gegen Aspergillaceen und Penicillium-Arten finden sich Angaben bei G. Finck. Auf Art und Beschaffenheit der antibiotischen Substanzen wird allerdings nicht eingegangen.

Auch Norén beschreibt zunächst die Antibiose von Ch. coraloides gegen gram-positive Keime. Dagegen konnte Kato bei M. fulcus eine antibiotische Aktivität sowohl gegen gram-positive als auch gram-negative Keime nachweisen.

Oxford und Kato berichten allerdings übereinstimmend, daß es sich bei dem wirksamen Prinzip offenkundig um eine sehr unstable Verbindung handeln muß, da die Wirksamkeit nur während einer bestimmten Wachstumsperiode im Nährboden nachweisbar war und mit abnehmender Wachstumsintensität rasch wieder verschwand.

Nachdem es offenbar bisher nicht gelungen war, die antibiotisch wirksamen Substanzen der Myxobakterien zu isolieren und chemisch zu identifizieren, schien daher die Gelegenheit günstig, bei der bisher unbekannten Wassernyxobakterienart Sporocytophaga cauliformis das antibiotische Prinzip hinsichtlich seines Wirkungsspektrums zu analysieren und die Reindarstellung und Identifizierung der Substanz vorzunehmen.

II.

1. Der Anteil antibiotisch wirksamer Stämme bei Sporocytophaga cauliformis

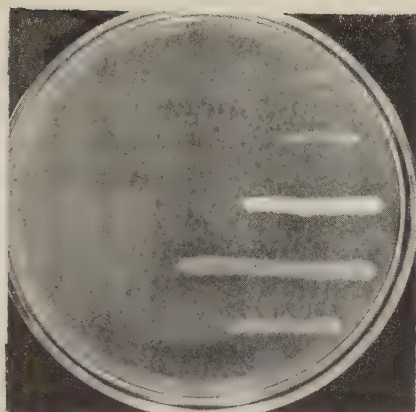
Zunächst galt es festzustellen, mit welcher Häufigkeit bei Sporocytophaga cauliformis antibiotisch wirksame Stämme zu erwarten sind, nachdem sich gezeigt hatte, daß diese Fähig-

keit nicht allen Stämmen zueigen war. Es standen 317 Stämme zur Verfügung, die aus verschiedenen Wasserproben des Überlinger Sees (Bodensee) und seinen Zuflüssen isoliert worden waren. Diese Stammsammlung erwies sich als besonders geeignet, da sie in biochemischer Hinsicht bereits genau untersucht worden war. Im vorliegenden Fall erwiesen sich 76 % der Stämme dem Typ I zugehörig, die restlichen 24 % waren als Typ II-Stämme anzusehen (Gräf und Stürzenhofecker).

Die Untersuchung dieser 317 Stämme auf antibiotische Fähigkeiten wurde im sogenannten Strichtest vorgenommen, nachdem sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, daß die antibiotische Aktivität dieser Wassermixobakterien sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien gerichtet war: Auf Moutonagarplatten,¹⁾ die sich wegen ihres geringen Nährstoffgehaltes besonders gut zur Kultivierung der Wassermixobakterien eignen, wird der zu testende Mixobakterienstamm strichförmig aufgeimpft und 24 Stunden bei 22° C vorwachsen gelassen. Dann werden senkrecht zu der entstandenen Strichkultur eine Auswahl verschiedener Testkeime (Sarcina lutea, Staphylococcus pyogenes aureus, Bac. cereus, Pseudomonas aeruginosa und E. coli) mit der Öse bis zum Rand der Mixobakterienkolonie strichförmig ausgeimpft. Handelt es sich um antibiotisch wirksame Mixobakterienstämme, so zeigt sich nach weiterem 1 - 2-tägigen Bebrüten bei 22° C, daß die Testkeime in der Umgebung der Mixobakterienstrichkultur mehr oder minder stark am Wachstum gehindert werden. Die Abb. 1 zeigt einen solchen Strichtest mit einem stark antibiotisch wirksamen Wassermixobakterienstamm der Spezies Sporocytophaga cauliformis.

Es wurden in der beschriebenen Weise alle 317 Stämme untersucht. Dabei ergaben sich, bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Unterteilung in Typ I- und Typ II-Stämme, die in Tabelle 1 niedergelegten Befunde.

¹⁾ Zusammensetzung: Fleischwasserbouillon 100,0
Agar 20,0
Aqua dest. ad 1000,0
pH = 7,2



Sarcina lutea

Staph. aureus

B. cereus

Ps. aeruginosa

E. coli

Abbildung 1:

Strichtest zur Ermittlung der antibiotischen Aktivität eines Wassermysobakterienstammes (*Sp. cauliformis*) gegen eine Auswahl gram-positiver und gram-negativer Keime. Es zeigt sich, daß die Hemmzonen gegenüber den gram-positiven Keimen am stärksten sind. Auch der gram-negative *E. coli*-Stamm wird, wenn auch etwas schwächer, gehemmt. *Ps. aeruginosa* ist gegen das Myxobakterienantibiotikum resistent.

Tabelle 1:

	Anzahl der Stämme	davon antibakteriell	%-Gehalt der Antibiotikabildner
Typ I	244	0	0 %
Typ II	73	39	53,4 %
Typ I und Typ II	317	39	12,3 %

Daraus ergibt sich, daß antibakterielle Aktivitäten nur bei Typ II-Stämmen vorhanden waren. Auch die biochemische Typisierung erweist sich in dieser Hinsicht als gerechtfertigt.

Allerdings kann man bei den Typ II-Stämmen nur von potentiellen Antibiotikabildnern sprechen. Von diesen produzieren nämlich nur 53,4 %, also etwas über die Hälfte, im Strichtest nachweisbare Antibiotikamengen. Da aber auch die antibakteriellen Stämme unterschiedlich starke Aktivitäten haben, ist es nicht ausgeschlossen, daß auch die im Strichtest negativ ausgefallenen Typ II-Stämme wenigstens in Spuren antibiotische Stoffe zu bilden vermögen.

Läßt man die Typenunterschiede außer acht, so ergibt sich, daß von den insgesamt 317 Myxobakterienstämmen 12,3 % Antibiotikabildner waren. Allerdings ist es nicht angängig, diese Prozentzahl als allgemein gültig anzusehen, da sich mittlerweile herausgestellt hat, daß das Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Stämmen je nach der Beschaffenheit des Entnahmebiotops sehr unterschiedlich sein kann und sich somit der Anteil der Antibiotikabildner dementsprechend verschiebt (Gräf und Stürzenhofecker).

2. Das antibiotische Spektrum von Sporocytophaga cauliformis

a) Wirksamkeit gegen Bakterien

Die Versuche im vorausgehenden Kapitel hatten ergeben, daß die Antibiose der Wassermyxobakterien sowohl gegen gram-positive als auch gram-negative Keime gerichtet ist. Es galt nunmehr festzustellen, gegen welche Bakterienarten im einzelnen eine antibiotische Wirkung zu erwarten ist und welche Keimart sich als resistent gegen das Myxobakterienantibiotikum erweisen würde. Es wurden daher eine große Auswahl der in der medizinischen Mikrobiologie bekanntesten und zur Verfügung stehenden pathogenen und apathogenen Bakterien im Strichtestverfahren mit 18 stark antibiotisch wirksamen Wassermyxobakterienstämmen geprüft.

Tabelle 2

Gegen Wassermixobakt. getestete Bakterienstämme		Wirksamkeit
<u>A) Gram-positiv</u>		
Staph. pyog. aureus	(8 Stämme)	+
Staph. albus	(5 Stämme)	+
Sarcina lutea	(6 Stämme)	+
Str. faecalis	(2 Stämme)	-
Str. mucosus		-
Bac. cereus		+
B. anthracoides		+
B. mycoides		+
B. mesentericus		+
B. panis viscosum		+
B. sphäricus		+
B. anthracis	(2 Stämme)	+
Cl. perfringens		+
Cl. tetani		-
Cl. histolyticum		-
Cl. botulinum		-
<u>B) Gram-negativ</u>		
Ps. aeruginosa	(6 Stämme)	-
Ps. fluorescens	(4 Stämme)	-
Serratia marescens	(6 Stämme)	-
E. coli	(10 Stämme)	+
E. coli mucosus		-
E. freundii		+
Aerob. aerogenes	(3 Stämme)	var.
Achromobacter		+
<u>Salmonellen</u>		
S. typhi	(8 Stämme)	+
S. paratyphi B	(2 Stämme)	+
S. paratyphi C		+
S. typhi murium	(2 Stämme)	+
S. enteritidis	(2 Stämme)	+
S. muenster		+
S. braenderup		+
S. bareilly		+
Shigella sonnei		+
Shigella dysenteriae		+
Shigella flexneri		+
Proteus vulgaris	(2 Stämme)	-
Proteus mirabilis	(3 Stämme)	-
Proteus 770 x 19		-
Klebsiella pneumoniae	(3 Stämme)	var.
Bakt. ozaenae	(3 Stämme)	+

+ = antibiotisch wirksam

- = nicht antibiotisch wirksam

var. = bei verschiedenen Stämmen verschied. Verhalten

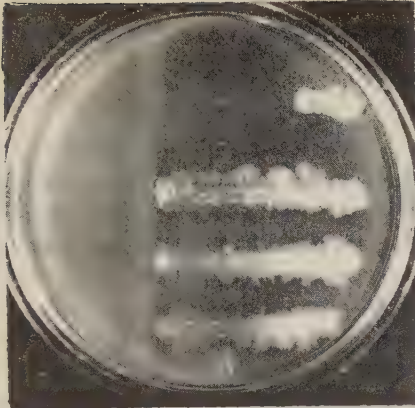
Das Ergebnis dieser Versuche gewährt einen guten Überblick über die bei Sporocytophaga cauliformis vorhandene Aktivität gegenüber anderen Bakterien. Im einzelnen ist das Antibakterienspektrum von Spor. cauliformis in Tabelle 2 niedergelegt.

Als Ergebnis läßt sich feststellen, daß es sich bei den antibiotisch wirksamen Stämmen von Spor. cauliformis immer um ein und dasselbe antibiotische Prinzip handeln muß, denn das Wirkungsspektrum ist bei allen 18 untersuchten Wasser-Myxobakterienstämmen vollkommen übereinstimmend. Es handelt sich um ein Antibiotikum, das zwar gegen gram-positive und gram-negative Keime wirksam ist, das aber unter den gram-positiven bzw. gram-negativen ein spezifisches Wirkungsspektrum aufweist. So wird z.B. von den anaeroben Sporenbildnern nur Cl. perfringens gehemmt (Abb. 2). Gegen Streptokokken scheint dagegen keine Wirksamkeit vorzuliegen. Unter den geprüften gram-negativen Testkeimen sind nur E. coli, alle geprüften Salmonellenarten und Shigellen empfindlich (Abb. 3). Der typische Wasserkeim Ps. fluorescens ist ebenso wie Ps. aeruginosa völlig resistent (Abb. 1).

Betrachtet man das Wirkungsspektrum der Wassermyxobakterien unter den Gesichtspunkten der natürlichen Gewässerselbstreinigung, dann ergibt sich, daß die Wassermyxobakterien eine fast elektive Wirksamkeit gegen pathogene und apathogene Enterobacteriaceae besitzen (E. coli, Salmonellen, Shigellen, Cl. perfringens).

b) Wirkung gegen Amöben (Protozoen)

Die Untersuchung auf protozide bzw. protostatische Aktivitäten bei den Wassermyxobakterien ist von Bedeutung, da sich hieraus wiederum wichtige Schlüsse auf die Reinigungsfunktion der Myxobakterien in Oberflächengewässern und Kläranlagentropfkörpern ergeben. Es ist die Frage, ob sich die Myxobakterien gegenüber



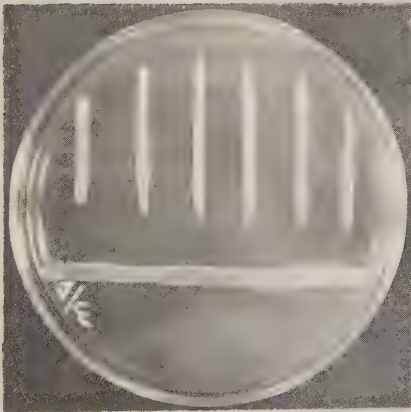
Cl. perfringens

Cl. tetani

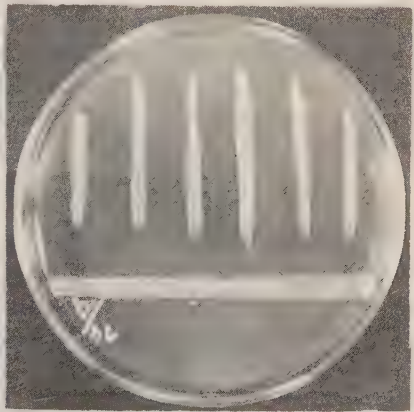
Cl. histolyticum

Cl. botulinum

Abbildung 2: Die Abb. zeigt im Strichtest die Wirkung eines antibiotikumbildenden Stammes von Spor. cauliformis gegen pathogene anaerobe Sporenbildner. Es zeigt sich, daß praktisch nur Cl. perfringens im Wachstum gehemmt wird, während Cl. tetani, Cl. histolyticum und Cl. botulinum praktisch unbeeinflusst blieben. Die Kultivierung erfolgte im Anaerobentopf.



a



b

Abbildung 3: Die Abbildung zeigt im Strichtest die Wirkung eines wirkstoffproduzierenden Stammes von Spor. cauliformis gegen verschiedene Salmonellen.
a: S. typhosa, S. paratyphi, S. schottmülleri, S. typhi murium, S. enteritidis und S. typhosa H.
b: S. typhosa, S. paratyphi B, S. enteritidis, S. muenster, S. braenderup und S. bareilly.

der keimvermindernden Aktivität der Protozoen synergistisch oder antagonistisch verhalten.

Nachdem schon mehrfach über symbiontisch-parasitische Beziehungen zwischen Amöben und Myxobakterien berichtet wurde (Kühlwein; Keller), schien auch unter diesen Gesichtspunkten das Verhalten der Wassermyxobakterien gegenüber Protozoen einer Untersuchung wert.

Bei der Prüfung auf protostatisch-protozide Eigenschaften wurde die gleiche Methodik benutzt, wie sie bei Klinge und Gräf zur Objektivierung der Protozoenwirksamkeit von Ps. fluorescens Anwendung gefunden hatte.

Auf Moutonagarplatten wurden die zu testenden Myxobakterienstämme strichförmig ausgeimpft und durch 24-stündiges Bebrüten bei 22° C eine Strichkultur erzeugt. Im Abstand von 1/2 bis 1 mm vom Schwärmsaum der Myxobakterienstrichkultur wurde nunmehr mit einer Öse ein Häufchen gut vegetativer Amöben (Amöba limax bzw. Amöba proteus) aufgesetzt. Die Amöben waren aus Schlammproben gezüchtet worden und standen für diese Versuche als diphasische Reinkultur (E. coli als Futterkeim) zur Verfügung. Nach Aufsetzen der Amöbenhäufchen am Rande der Myxobakterienstrichkultur wurde regelmäßig das Verhalten der Amöben makroskopisch und mikroskopisch geprüft.

Nach Klinge und Gräf liegen stark protozide Eigenschaften der Testkeime dann vor, wenn bei diesem Vorgehen schon innerhalb einer bis einiger Stunden eine Lyse, d.h. ein restloser Zerfall der aufgeimpften Amöben an Ort und Stelle stattgefunden hat. Bei Fehlen von protoziden-protostatischen Wirkungen schwärmen die Amöben sofort von der Impfstelle aus in die Strichkultur hinein und weiden den Bakterienrasen innerhalb von 1 bis 2 Tagen ab. Werden schwächere protozoenwidrige Stoffe gebildet, so werden die Amöben ganz oder teilweise am Ausschwärmen verhindert und beginnen sich rasch zu enzystieren.

Auf diese Weise wurde der gesamte Bestand von 317 Stämmen Sporocytophaga cauliformis untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß protozide Wirkungen bei den Wassermyxobakterien grundsätzlich nicht vorhanden sind. Allerdings zeigte sich, daß bei den verschiedenen Myxobakterienstämmen große Unterschiede hinsichtlich ihrer Futterqualität für Amöben bestehen und daß sogar bei einer Anzahl von Stämmen sicher protostatische Stoffe in die Nährbodenumgebung abgegeben werden. Es konnte demnach folgendes unterschiedliche Verhalten der unmittelbar am Rand einer Myxobakterienstrichkultur aufgesetzten Amöben festgestellt werden:

- a) Ausschwärmen in die Myxobakterienkolonie, Fressen derselben und Durchwanderung (Abb. 4).
- b) Ausschwärmen in die Myxobakterienkolonie, verzögertes Fressen und schließlich Enzystierung.
- c) Kurzes Ausschwärmen in die Myxobakterienkolonie, kein Fressen, sofortige Enzystierung (Abb. 5).
- d) Punktförmiges Verharren der Amöben, Enzystierung bzw. Flucht vor den Myxobakterien (Abb. 6).

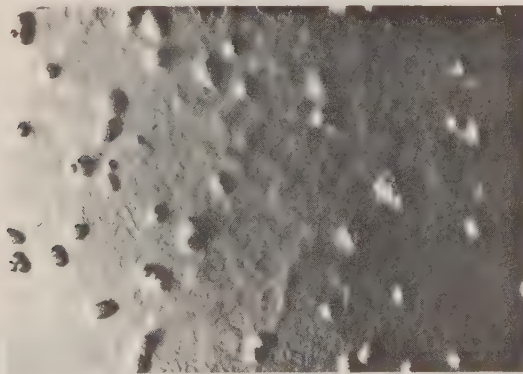


Abbildung 4:

Die Abbildung zeigt das Verhalten "a" der Amöben in einer Wassermyxobakterienkultur. Die Amöben wandern in den Myxobakterienrasen ein und phagozytieren die Keime.

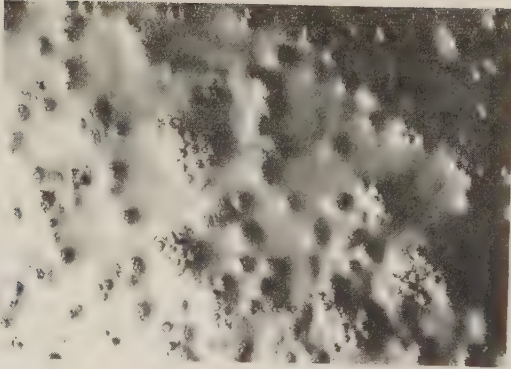


Abbildung 5:

Hier wird das "c"-Verhalten der Amöben im Myxobakterienrasen gezeigt. Die Amöben durchwandern den Myxobakterienrasen ohne zu phagozytieren und beginnen rasch mit der Enzystierung.

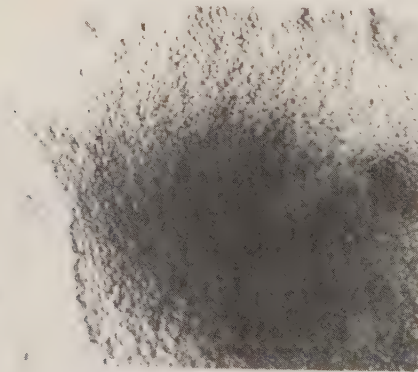


Abbildung 6:

Die Abbildung zeigt die Verhaltensweise "d" der Amöben. Die aufgeimpften Amöben bleiben als Häufchen an der Impfstelle liegen und enzystieren sich dort.

Eine echte protostatische Wirkung ist demnach nur bei dem Amöbenverhalten "d" vorhanden, da hier die Amöben am Auschwärmen gehindert werden, ohne allerdings abzusterben. Bei der Verhaltensweise "c" und z.T. auch noch bei "b" liegt offenbar nur eine für Amöben ungeeignete Futterqualität vor.

Die Untersuchung der 317 Wassermyxobakterienstämme in der genannten Hinsicht ergab, unter Berücksichtigung der Klassifizierung in Typ I und Typ II, die in Tabelle 3 niedergelegten Befunde:

Tabelle 3

	Verhaltensweise der Amöben				Summe
	a	b	c	d	
Gesamtzahl der Stämme	70	185	29	33	317
davon Typ I	68	158	10	8	244
davon Typ II	2	27	19	25	73

Somit sind protostatische Eigenschaften nur bei 33 von insgesamt 317 Stämmen vorhanden, das sind 10,4 %. Diese protostatische Aktivität verteilt sich dazu noch auf beide Typen, so daß offenbar mit der antibakteriellen Wirksamkeit keine unmittelbare Parallelität besteht. Trägt man die Ergebnisse von Tabelle 3 in ein Koordinatensystem ein, wodurch sich das Amöbenverhalten der 317 Stämme getrennt nach Typ I und nach Typ II kurvenmäßig erfassen läßt, so ergeben sich 2 voneinander stark abweichende Kennkurven für Typ I bzw. Typ II (Diagramm 1).

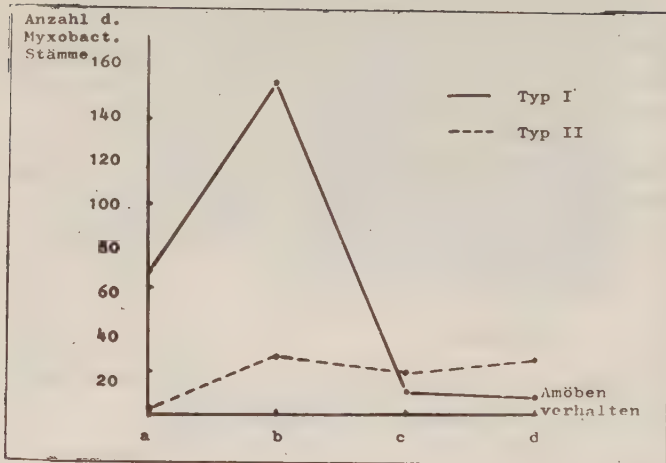


Diagramm 1

Das aus Diagramm 1 ablesbare Amöbenverhalten von Typ I und Typ II zeigt, daß die Myxobakterienstämme der Typ I-Gruppe verhältnismäßig gut bis mäßig gefressen werden und daß eine Protostase in zwar geringem Umfange aber immerhin deutlich vorhanden ist. Schwerer ist das Amöbenverhalten der Typ II-Stämme, wie es sich aus Diagramm 1 ergibt, zu deuten. Es liegen 2 Maxima vor, die vermuten lassen, daß hier eine Überlagerung zweier wirksamer Prinzipien vorliegen muß.

Diese Annahme findet ihre Bestätigung, wenn man das Amöbenverhalten der Typ II-Stämme aufgliedert in die Gruppe der antibakteriell wirksamen Typ II-Stämme und der nichtantibakteriellen. Das Ergebnis findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4

	Verhaltensweise der Amöben				Summe
	a	b	c	d	
Typ II "anti-bakteriell"	0	6	10	23	39
Typ II nicht antibakteriell	2	17	12	3	34

Zur besseren Veranschaulichung sollen wiederum die Werte von Tabelle 4 kurvenmäßig aufgetragen werden (Diagramm 2).

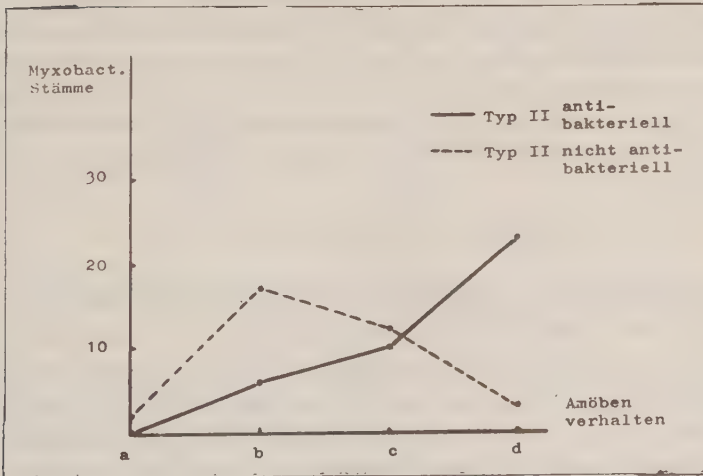


Diagramm 2

Aus Diagramm 2 läßt sich unschwer ablesen, daß die protostatische Eigenschaft bei den Typ II-Stämmen auf 2 Komponenten beruht.

Bei den nicht antibakteriell wirksamen Typ II-Stämmen ist dieselbe Verhaltensweise wie bei der großen Gruppe der Typ I-Stämme anzutreffen, d.h. der größte Teil der Stämme zeigt mäßiges Gefressenwerden durch Amöben, ein geringer Anteil jedoch scheint daneben protostatische Eigenschaften zu besitzen.

Anders verhalten sich die antibakteriell wirksamen Typ II-Stämme. Hier ist ein stetiger Anstieg der protostatischen Eigenschaften zu verzeichnen, d.h. hier überlagert sich dem normalen Protozoenverhalten der Myxobakterien die Wirkung des antibakteriellen Stoffes, der offenbar auch protostatische Eigenschaften besitzt. Somit sind als Grundlage der protostatischen Eigenschaften bei Wassermyxobakterien 2 Faktoren anzunehmen: Einmal eine protostatische Aktivität, die ohne Unterschied bei beiden Typen (etwa 4 - 8 % der Stämme) vorhanden ist, und zum andern das von einem Teil der Typ II-Stämme produzierte Antibiotikum, das offenbar neben seinen bakteriostatischen Eigenschaften auch noch geringe protostatische Wirkungen besitzt.

3. Die Isolierung und Reindarstellung des Antibiotikums aus Sporocytophaga cauliformis

Da bei allen antibiotisch wirksamen Myxobakterienstämmen die antibakterielle Wirkung im Vordergrund stand, wurde versucht, auf dieser Basis das betreffende Antibiotikum zu isolieren. Es wurde zu diesem Zweck ein besonders stark antibiotisch wirksamer Myxobakterienstamm ausgewählt und bei allen Extraktionsversuchen verwendet.

Die Gewinnung der wirksamen Substanz war natürlich nur dann zu erwarten, wenn es gelang, eine genügend große Masse junger vegetativer Myxobakterien zur Verfügung zu haben und wenn gleichzeitig die zu extrahierenden Bakterienmassen weitgehend frei von Nährbodenbestandteilen waren. Aus diesem Grund wurde von der Verwendung flüssiger Nährböden abgesehen, da in diesem Falle weder die eine noch die andere dieser Forderungen zu erfüllen war. Es blieb also nur die Verwendung fester Nährböden (Agarplatten), von deren Oberfläche der dicht gewachsene Bakterienrasen leicht abgehoben werden konnte, ohne daß Nährbodenbestandteile in größeren Mengen dabei mit erfaßt wurden. Im einzelnen wurde die Gewinnung der zu extrahierenden Myxobakterienmasse wie folgt vorgenommen:

Die Beimpfung der Nährbodenschalen erfolgte mit einer wässrigen Keimsuspension, die durch Einbringung einer entsprechenden Menge von Myxobakterien in steriles Aqua dest. erhalten wurde. Die wässrige Keimsuspension zeigte gerade eine sichtbare Trübung. Der zur Kultivierung verwendete gallertige Nährboden bestand aus:

Pepton	10,0 g
Agar	20,0 g
Glucose	5,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
(pH = 7,2; Glucosezusatz erfolgte nach der Sterilisation im Autoklaven)	

Von der oben beschriebenen Keimsuspension wurden je 6 Tropfen auf jede Nährbodenschale verimpft und mit Glasspateln auf der Agaroberfläche gleichmäßig verteilt. Die Bebrütung der Platten erfolgte 2 - 3 Tage lang bei 22° C. Nach dieser Zeit hatte sich auf der Agaroberfläche eine etwa 0,5 - 1 mm dicke, schleimige Myxobaktérienschicht von orange-gelber Farbe gebildet, deren Viskosität eine nahezu quantitative Entnahme von der Agaroberfläche mittels eines Glasspatels gestattete. Damit standen bei entsprechendem Plattensatz (40 Platten pro Charge) ausrei-

chende Mengen junger vegetativer Wassermixobakterien zur Verfügung, die das gesuchte Antibiotikum in nachweisbaren Mengen enthalten mußten.

Die Extraktionsversuche der vegetativen Bakterienmasse mit einer Reihe der gebräuchlichsten organischen Lösungsmittel, wie z.B. Alkohole, Azeton, Äther, Chloroform, verliefen völlig negativ. Die Lösungsmittlextrakte, die nach Abdampfung des betreffenden Lösungsmittels zurückblieben, zeigten wässrig gelöst, im Lochtestverfahren gegen Staph. pyogenes aureus keinerlei hemmende Wirkung.

Um überhaupt ein bakterienfreies, wässrig gelöstes antibiotisches Prinzip nachweisen zu können, wurde nunmehr ein anderer Weg eingeschlagen:

Die von den Nährbodenplatten gewonnenen schleimigen Bakterienmassen wurden in sterilem Aqua dest. aufgeschwemmt, so daß eine gelb-orange Suspension von supziger Konsistenz entstand. Um eine schonende Freisetzung des in der Bakterienzelle vorhandenen Wirkstoffes zu gewährleisten, wurde diese wässrige Keimsuspension 10 Min. lang ultrabeschallt. Dann wurde die Abtrennung des größten Anteils der suspendierten Teilchen durch scharfes Zentrifugieren vorgenommen. Der orange-gelbe, noch nicht klare Überstand wurde abgehebert und durch Sterilfiltration mittels Membranfilter (50 μ) völlig geklärt. Auf diese Weise läßt sich eine orange-gelbe, klare Flüssigkeit gewinnen, die unter der UV-Analysenlampe stark grün-bläulich fluoresziert. Dieser wässrige Myxobakterienextrakt erwies sich im Lochtest als stark wachstumshemmend gegen Staph. pyogenes aureus und gegen E. coli (Abb. 7).

Damit war erwiesen, daß es sich bei dem antibakteriellen Prinzip der Wassermixobakterien um eine wasserlösliche Substanz handeln muß, die auch außerhalb der Myxobakterienzellen ihre antibiotische Aktivität unverändert beibehält.

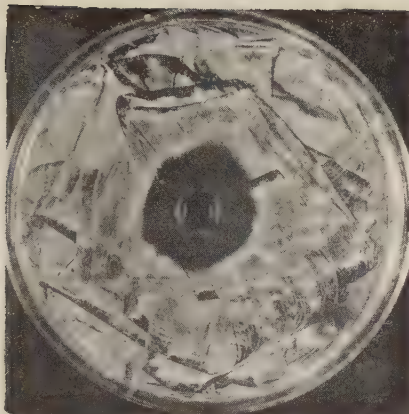


Abbildung 7: Lochtest gegen *Staph. pyog. aureus* mit wässrigem Rohextrakt von *Sporocytophaga cauliformis*.

Es mußte nun festgestellt werden, ob das antibakterielle Prinzip der Wassermysobakterien eine antibiotische Substanz ist, oder ob es sich vielleicht um einen Stoff mit Enzymcharakter handelt. Eine weitgehende Klärung dieser Frage erbrachte ein einfacher Vorversuch:

Selbst nach 1-stündiger Verweildauer im Dampftopf bei 100° C behielt der wässrige Extrakt seine Wirksamkeit bei, so daß ein Enzym als Wirkungsprinzip mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte.

Nun galt es, für das Myxobakterienantibiotikum ein geeignetes organisches Lösungsmittel zu finden, das aus den Bakterienmassen eine weitgehend quantitative Extraktion gestattete.

Da sich im Vorversuch schon gezeigt hatte, daß sowohl mit den üblichen Lösungsmitteln der Alkoholreihe als auch mit Lipoidlösungsmitteln kein Erfolg zu erzielen war, wurden im Großversuch 36 organische Lösungsmittel auf ihre diesbezügliche Brauchbarkeit geprüft (Tabelle 5).

Tabelle 5

Verwendete organische Solventien	Löslichkeit des Myxobakt.-Wirkstoffes aus den Antibiotikumteststreifen
Formamid	-
Methanol	-
Äthanol	-
Aceton	-
n-Propanol	-
Dioxan	-
Tetrahydrofuran	-
Methyläthylketon	-
n-Butanol	-
Cyclohexanol	-
n-Amylalkohol	-
Äthylacetat	-
n-Hexanol	-
sym-Collidin	-
Furan	-
Äther	-
n-Octanol	-
Isopropylalkohol	-
Pyridin	-
Formalin	-
Likrinsäure	-
Tetralin	-
Dimethylformamid	-
Äthylendichlorid	-
Benzoylchlorid	-
Propylenglycoll	-
n-Butyläther	-
Methylenchlorid	-
Chloroform	-
Isoamyläther	-
Benzol	-
Toluol	-
Xylol	-
Hexan	-
Petroleum	-
Petroläther	-
(-) bedeutet unlöslich	

Der wässrige aktive Extrakt wurde auf rechtwinkelige Papierstreifen in der Mitte konzentriert aufgetragen und angetrocknet. Die so erhaltenen Antibiotikumteststreifen zeigten im Strichtest gegen Staph. pyog. aureus und E. coli die bekannte

Hemmwirkung. Diese Teststreifen wurden nun in Reagenzgläsern mit mehr als 30 organischen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur 60 Min. lang eluiert und anschließend im warmen Luftstrom getrocknet.

Eine Minderung der antibiotischen Aktivität war bei den Teststreifen durch keines der 36 Lösungsmittel zu erzielen.

Anschließend wurden die zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel zur Trockne eingeeengt und bei Vorhandensein eines Rückstandes, dieser in wenig Wasser aufgenommen und im Lochtest gegen Staph. aureus getestet. Das Ergebnis war, daß keiner dieser Extrakte antibiotische Wirksamkeit nachweisen ließ.

Es war also nicht gelungen, die gesuchte antibiotische Substanz in einem der 36 Lösungsmittel zu lösen. Nur das gelbe Myxobakterienpigment konnte in Methanol, Äthanol, Azeton und Chloroform in Lösung gebracht werden. Wurden diese Pigmentlösungen zur Trockne eingeeengt, so blieb stets eine wachsartige, dunkelrotbraune, klebrige Masse von lipoidartigem Charakter zurück, die schwer in Wasser löslich war und keinerlei antibakterielle Wirkung zeigte.

Nunmehr wurde die Extraktion des Antibiotikums mit denselben 36 organischen Lösungsmitteln unter Erwärmung versucht: Die mit Lösungsmittelteststreifen beschickten Reagenzgläser wurden im Wasserbad einmal bei 60° C und in einer anderen Versuchsreihe bei 80° C (je nach Siedepunkt der verwendeten Solventien) eine Stunde lang extrahiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

Es zeigte sich, daß auch bei vorsichtigem Erwärmen mit organischen Lösungsmitteln die gesuchte Substanz nicht in Lösung zu bringen war.

Damit ergab sich die Tatsache, daß sich das gesuchte Antibiotikum ausschließlich in Wasser lösen ließ. Es war nicht

gelingen, ein organisches Lösungsmittel für diesen Stoff zu finden.

Alle herkömmlichen Methoden zur Erreichung einer Reindarstellung waren durch das eigenartige Lösungsverhalten des Antibiotikums unbrauchbar geworden.

Somit mußte mit großen Schwierigkeiten gerechnet werden, um den aktiven Wirkstoff rein und kristallin darzustellen.

In einer Reihe von umfangreichen Versuchsanordnungen wurde ein geeigneter Weg gesucht, um eine Abtrennung des Pigmentes und anderer nicht aktiver Begleitstoffe von dem aktiven Wirkstoff zu erzielen.

Als erstes wurde mittels wässriger Dialyse versucht, das Pigment von der Wirksubstanz abzutrennen. Eine vollständige Trennung der Wirkstoffphase von der Pigmentphase war nicht zu erreichen, da auch Teile des Pigmentes mit der Wirksubstanz dialysabel waren.

Auch die Versuche, auf elektrophoretischem Wege eine Aufgliederung der Rohsubstanz zu erreichen, schlugen fehl, obwohl eine Reihe von verschiedenen Puffern zur Anwendung kamen.

Das wässrige Rohantibiotikum wurde nunmehr aufsteigend mit unterschiedlichen Laufmitteln papierchromatographiert. Dieses Verfahren scheiterte jedoch daran, daß das Pigment die Auftrennung bzw. das Aufsteigen der aktiven Phase verhinderte.

Auch säulenchromatographisch erfolgte keine vollständige Trennung des Pigmentes von der Wirkstoffphase. Sowohl neutrales Al_2O_3 als auch basisches Al_2O_3 adsorbierten weder das Pigment noch die Wirkstoffkomponente. Lediglich saures Al_2O_3 zeigte eine gute Adsorptionswirkung gegenüber dem Pigment. Diese Methode war aber nicht durchführbar, da die zu großen Pigmentanteile des Rohantibiotikums ein gleichmäßiges Durchlaufen verhinderten und die gesamte Al_2O_3 -Säule verstopften.

Im Folgenden werden nun 2 Methoden beschrieben, die es gestatten, eine nahezu von Verunreinigungen und Pigmenten freie Wirkstofflösung zu erhalten, die trotz zahlreicher Behandlungsweisen ihre volle antibiotische Wirksamkeit beibehalten hatte und zur Auskristallisation gebracht werden konnte.

a) Acetonmethode

Die von den Glucose-Anreicherungsplatten abgespatelten Myxobakterien wurden jetzt, statt wie bisher in Wasser, in wasserfreies Aceton eingebracht und darin mit dem Magnetrührer 5 Min. in Bewegung gehalten. Das Pigment der vegetativen Myxobakterien löste sich zum größten Teil im Aceton und nach dreimaliger gleicher Behandlung der Bakterien waren diese nahezu farblos. Trotzdem wurden sie nochmals in wasserfreiem Methanol aufgeschwemmt, um noch die letzten Aceton-unlöslichen Spuren des Pigmentes zu beseitigen. Anschließend wurde von diesem abzentrifugiert.

Das mit dem Pigment beladene Aceton wurde abdestilliert und die entstehende, nicht im UV-Licht fluoreszierende Pigmentmasse wurde mit einem Lösungsvermittler in etwas Wasser aufgenommen und einem Lochtest gegen Staph. aureus unterworfen. Die Hemmwirkung war in allen Fällen negativ.

Die nahezu farblosen Bakterienleiber wurden erst jetzt mit sterilem destilliertem Wasser eluiert und zwar so, daß sie mit dem Magnetrührer 15 Min. bewegt wurden. Darauf wurden sie abzentrifugiert und man erhielt eine klare, hellgelbe, die Glaswände nicht benetzende, mit charakteristischem Geruch ausgezeichnete Antibiotikumlösung, die im UV-Licht eine starke Fluoreszenz zeigte. Im Lochtest gegen Staph. aureus getestet, konnte eine sehr starke Hemmung des Wachstums beobachtet werden.

Diese klare Antibiotikumlösung wurde in der Weiterverarbeitung mit der doppelten Menge Aceton versetzt und über nacht

stehen gelassen. Anderntags wurde die durch das Aceton zur Ausfällung und Ausflockung gebrachte Proteinmasse abzentrifugiert und aus dem klaren Überstand das Aceton bei 40° C ausgetrieben.

Die verbleibende wässrige Lösung zeigte nur eine geringe Farbveränderung, ebenso unverändert blieb die sehr gute aktive Hemmwirkung gegen Staph. aureus, die im Lochtest nachgewiesen werden konnte.

Die abzentrifugierten Proteinmassen zeigten dagegen, wenn man von ihnen eine wässrige Aufschwemmung machte, im Lochtest gegen die üblichen Testbakterien keinerlei hemmende Aktivität. Die so erhaltene, vorgereinigte und schon zum größten Teil pigmentfreie Wirkstofflösung wurde nunmehr säulenchromatographiert, um die letzten noch vorhandenen Pigmentspuren zu entfernen.

Verwendet wurde ausschließlich saures Al_2O_3 , welches imstande war, die Pigmente zu adsorbieren. Das Eluat hatte seine starke Wirksamkeit behalten.

Die jetzt klare, hellgelbe Flüssigkeit wurde auf großen Uhrgläsern im Trockenschrank bei 40° C zur Trockene eingengt. Es bildeten sich schon dem unbewaffneten Auge sichtbare Kristalle, die im mikroskopischen Bild einen parkettartigen eigentümlichen Aufbau zeigten. (Abb. 8).

Die Wasserlöslichkeit der Kristalle war erhalten geblieben, ihre Farbe war leicht gelblich-durchsichtig.

An den äußeren Rändern der Uhrgläser hatte sich ein breiter Ring einer wasserunlöslichen Substanz abgesetzt. Bei dem vollständig zur Trockene eingengten Flüssigkeitsvolumen konnte daher bei einer Wiederauflösung in Wasser nur ein etwa 2 bis 3 cm im Durchmesser betragender runder Fleck in der Mitte jedes Uhrglases wieder in Lösung gebracht werden, welcher die auskristallisierte aktive Phase des Wirkstoffes darstellte.

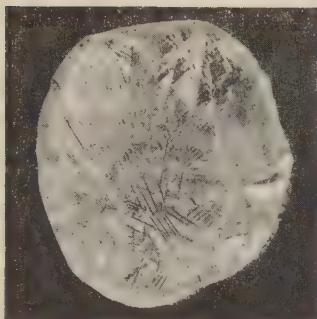


Abbildung 8:

Die auskristallisierte Rohsubstanz, wie sie nach der Aceton- bzw. Dialysenmethode erhalten wird.

Es wurden nur diese, sich in der Mitte befindlichen Kristalle weiterverarbeitet. Bei zwei- bis dreimaliger Wiederholung des oben beschriebenen Vorganges konnten die Kristalle weitgehend gereinigt werden. Auffallend war bei diesen Prozessen, daß mit öfterem Umkristallisieren die erst hellgelbe Farbe der Wirkstofflösung langsam nachdunkelte. Eine Beeinträchtigung der Wachstumshemmung gegen verschiedene Testkeime konnte dadurch aber nicht festgestellt werden, ebenso unbeeinträchtigt blieb das Auskristallisieren der aktiven Phase selbst. Die Kristalle waren allerdings nachgedunkelt. Damit war eine kristalline Rohsubstanz gewonnen, deren endgültige Reinigung auf papierchromatographischem Wege zu erreichen war.

Zu der gleichen stark antibiotisch wirksamen, angereicherten Wirkstofflösung, die im UV-Licht stark grün-bläulich fluoresziert und nach Abtrennung des Wassers eigenartig gestaltete Kristalle bildet, kam man auch durch ein anderes Vorgehen:

b) Dialysemethode

Die unter der Acetonmethode erhaltenen nahezu farblosen Bakterienleiber wurden in wenig destilliertem Wasser aufgeschwemmt

und der Dialyse unterworfen. Dialysiert wurde in einem Cellophan-Dialysator, der unten abgebunden und in einem Standzylinder mit 200 ml sterilem, destilliertem Wasser umgeben war. Diese 200 ml Wasser wurden jeweils nach 1 Std., 12 Std., 16 Std., 18 Std. und 24 Std. erneuert; die Temperatur betrug während der Dialyse 20° C. Ergebnisse:

Schon nach einstündiger Dialysierzeit wurde eine farblose, im UV-Licht schwach bläulich fluoreszierende Lösung erhalten, die keine Trübung und Verfärbung zeigte. Von den ersten 200 ml Außenflüssigkeit wurden 100 ml im Trockenschrank sofort vom Wasser befreit. Der entstehende, nicht kristalline Rückstand wurde in etwas Wasser aufgenommen und zeigte eine gute Aktivität im Lochtest gegen Staph. aureus.

Nach weiterer 12-stündiger Dialyse zeigte die erneuerte wässrige Lösung eine grün-gelbliche Färbung und eine ebensolche farbiges Fluoreszenz im UV-Licht. Es wurden wieder von den 200 ml 100 ml zur Trockene eingengt. Der nicht kristalline Rückstand, zeigte im Lochtest gegen verschiedene Testkeime eine sehr gute Aktivität.

Bei fortgesetzter 16- bzw. 18-stündiger Dialyse ergaben sich in den jeweils erneuerten Außenflüssigkeiten nur noch geringe Aktivitäten und ein zunehmender Farbstoffgehalt.

Nach einer 24-stündigen Dialyse hatte die wässrige Lösung nur noch einen grün-gelblichen Farbton ohne nachweisbare Aktivität.

Die so gewonnenen Dialysate wurden durch saure Al_2O_3 -Säulen geschickt. Soweit eine Pigmentfärbung noch vorhanden war, was hauptsächlich für die Chargen der 12-, 16- und 18-stündigen Dialyse zutraf, wurde dadurch eine Aufhellung der wässrigen antibiotischen Lösung erreicht.

Die bei dem Einengen der ersten Dialysate im Trockenschrank gemachte Beobachtung, daß dabei rasch eine Trübung und dann zu-

nehmend mit der Zeit eine starke Ausflockung von Proteinen erfolgte, konnte bei den durch saure Al_2O_3 -Schichten geschickten Chargen nicht mehr festgestellt werden.

Die Behandlung mit saurem Al_2O_3 entfärbte also nicht nur die pigmenthaltige, antibiotische Wirkstofflösung, sondern sie stabilisierte gleichzeitig deren chemisches und physikalisches Verhalten.

Wurden die klaren, fast farblosen Lösungen auf weiten Uhrenschaalen im Trockenschrank eingeeengt, so war der Rückstand in den bekannten Mustern flächig auskristallisiert (Abb. 8).

Damit war die gleiche kristalline Rohsubstanz gewonnen, wie sie auch nach der Acetonmethode anfiel.

Um den Wirkstoff in völlig reiner und kristalliner Form zu erhalten, wurde am Ende jedes Arbeitsganges die Papierchromatographie angewandt. Dabei war es gleichgültig, welches Laufmittel verwendet wurde. Zur Auswahl standen:

1. Butanol-Wasser-Methanol (9:1:1)
2. Wassergesättigtes Butanol
3. Colidin-Lutidin wassergesättigt und
4. Butanol-Wasser-Eisessig (9:1:1)

Das nach Auflösung der kristallinen Rohsubstanz erhaltene wässrige Antibiotikum-Konzentrat wurde strichförmig und konzentriert - 2 ml Konzentrat auf eine Papierstrecke von 15 cm Breite - in einem Abstand von 2,5 cm von der Fließmitteloberfläche auf Chromatographierpapier von Schleicher & Schüll 2043 bM aufgetragen und angetrocknet. Chromatographiert wurde aufsteigend in Kammern von 50 cm Höhe und 23 cm Breite, die mit einer gesättigten Atmosphäre des benutzten Fließmittels angefüllt waren. Zur Chromatographie kamen gleichzeitig mehrere Chromatogramme, pro Kammer im allgemeinen sechs. Als Fließmittel wurde Butanol-Wasser-Eisessig (9:1:1) verwandt. Die Chromatographierzeit betrug jeweils zwischen 18 und 24 Stunden.

Von jedem Chromatogramm wurden schmale Streifen der Länge nach abgeschnitten und die mit Ninhydrin-Reagenz und UV-Licht reagierenden Zonen markiert. Die so markierten, entwickelten Streifen dienten als Schablone für das eigentliche Chromatogramm, damit die einzelnen Zonen - auch die fluoreszierenden - ausgeschnitten und mit Wasser eluiert werden konnten.

Die sich nach Ninhydrin-Entwicklung der Chromatogramme ergebenden Zonen sind zusammen mit den ninhydrin-negativen, im UV-Licht stark fluoreszierenden Zonen in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

Es fanden sich 6 ninhydrin-positive Zonen (a, b, c, d, e, f). Die am stärksten hervorstechende ninhydrin-positive Zone (b) mit einem R_f -Wert von 0,29 befand sich in engster Nachbarschaft mit einer im UV-Licht stark blau fluoreszierenden ninhydrin-negativen Zone (b') von etwas geringerem R_f -Wert (0,22).

Eine ähnliche, jedoch wesentlich schwächere Doppelzone befand sich oberhalb von den Startlinien der Chromatogramme (a bzw. a').

Bei der Elution der 6 Zonen, wobei die beiden Doppelzonen (a/a' und b/b') gemeinsam eluiert wurden und anschließend im Lochtest auf antibakterielle Wirksamkeit geprüft, zeigten nur die Doppelzonen b/b' eine sehr gute Aktivität, während die übrigen Eluate völlig wirkungslos waren (Abb. 11).

Somit war die Doppelzone b/b' als der gesuchte Wirkstoff anzusehen. Dementsprechend waren auch bei Einengung der wässrigen Eluate dieser Doppelzone wieder die bekannten Kristalle, jetzt in gereinigter Form vorhanden (Abb. 10).

Wird dieser kristalline Stoff nunmehr nochmals chromatographiert, unter Verwendung von wassergesättigtem Butanol als Fließmittel, so gelingt eine bessere räumliche Trennung der beiden Zonen b/b' (Abb. 13), die es gestattete, beide Zonen getrennt zu eluieren und auf ihre Aktivitäten zu testen.

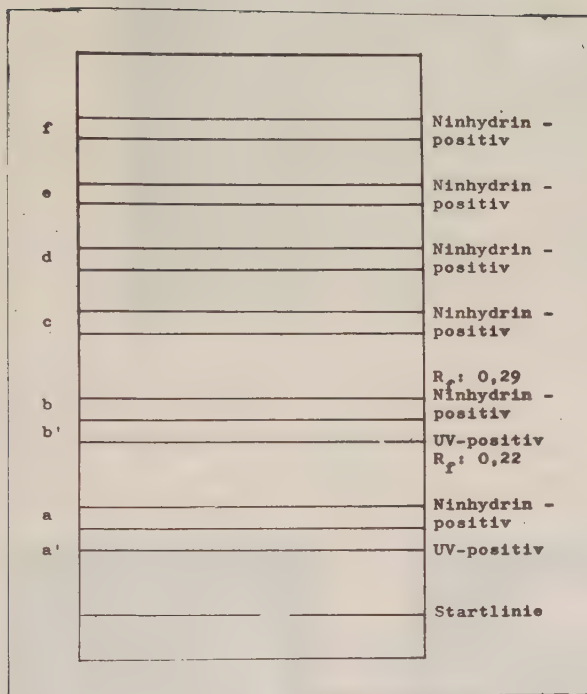


Abbildung 9 :

Schema eines entwickelten Chromatogrammes mit ninhydrin-positiven und UV-Licht positiven Zonen.

Das Ergebnis war, daß nur die ninhydrin-positive Zone (b) eine antibakterielle Wirkung entfaltete, die aber wesentlich schwächer war als die der Ausgangssubstanz. Die ninhydrin-negative, fluoreszierende Zone b' war allein völlig wirkungslos. Gibt man jedoch beide Substanzen (b und b') wieder zusammen, so entfalten sie die bekannte starke antibakterielle Wirkung (Abb. 12).

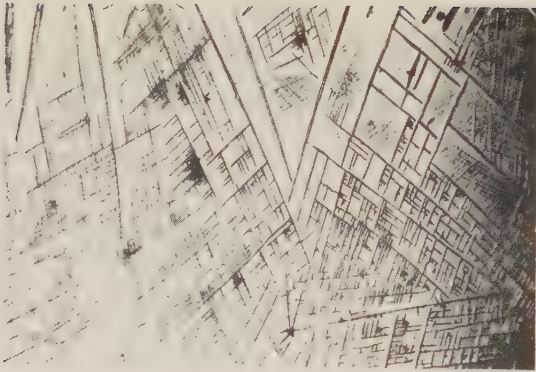
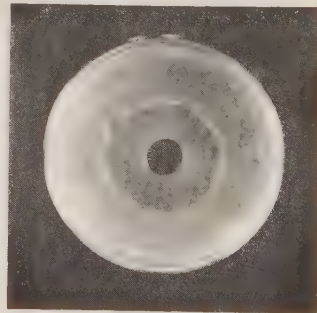
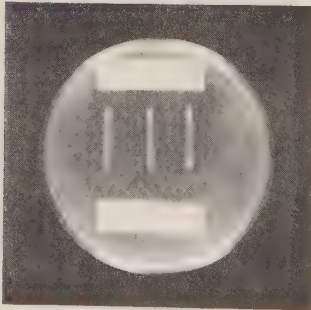


Abbildung 10:

Die Abbildung zeigt die reinen, farblosen Kristalle des Wassermyxobakterienwirkstoffes.



B

Abbildung 11:

- a) Die Zone b/b' als solche im mikrobiologischen Test gegen Strichkulturen von Staph.aureus.
- b) Der Lochtest des wässrigen Eluats aus den gemeinsam eluierten Zonen (b/b') mit den R_f -Werten 0,22 und 0,29 gegen Staph. aureus.

Eine Aktivität blieb auch dann aus, wenn von den einzelnen Lösungen der eluierten Streifen (a, c, d, e, f) ein Gemisch hergestellt und dieses im Lochtest gegen Staph. aureus getestet wurde. Erst nach Zugabe eines gleichen Teiles von der aus der Doppelzone b/b' erhaltenen, im Einzeltest stark wirksamen Lösung, konnte eine Wachstumshehmung erreicht werden.

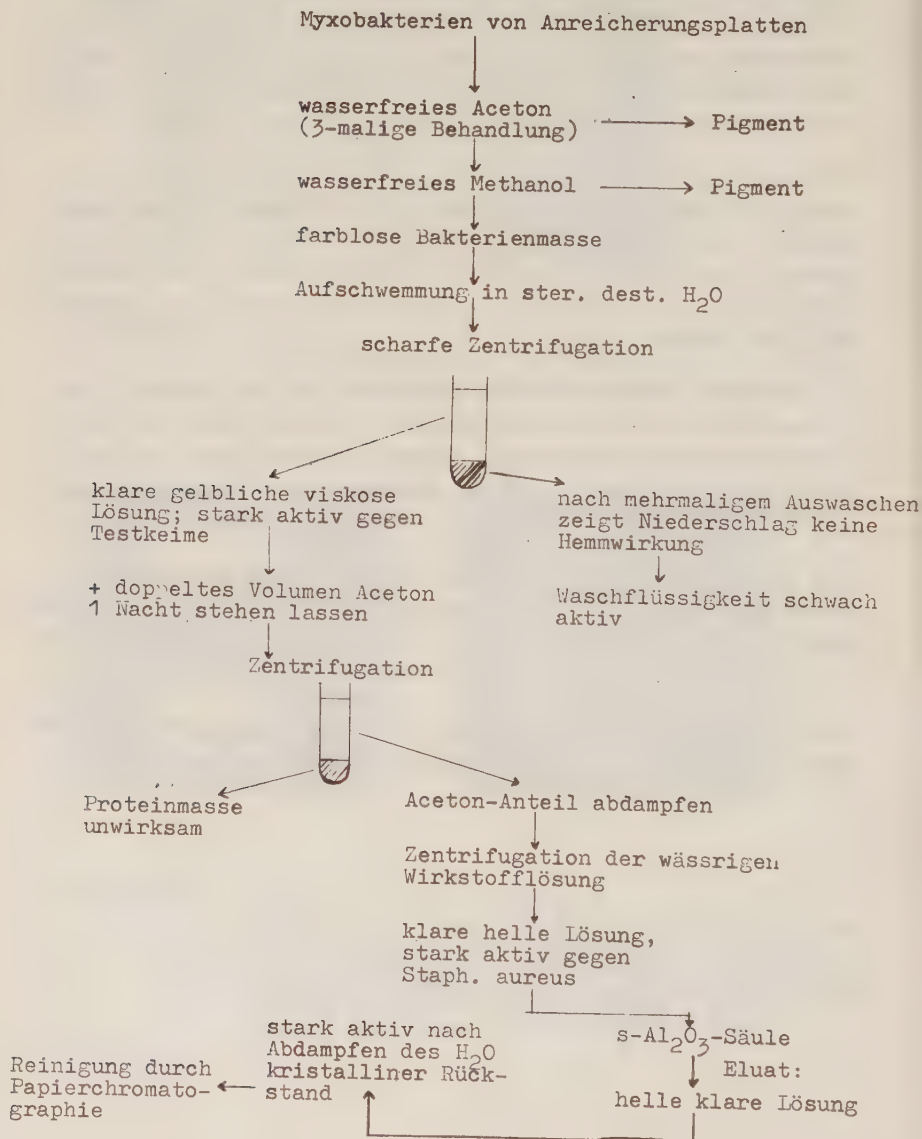
Eine geringe Aktivität konnte auch noch nach Eluierung der ausgeschnittenen Startlinie des Chromatogrammes nachgewiesen werden, welches wahrscheinlich dadurch bedingt war, daß die große aufgetrocknete Menge des wässrigen Wirkstoffkonzentrates nicht von den jeweiligen Fließmitteln restlos forttransportiert werden konnte.

Das gesuchte Myxobakterien-Antibiotikum besteht demnach aus 2 Substanzen, in dem Sinne, daß die antibakterielle Wirksamkeit der ninhydrin-positiven Substanz b durch eine für sich allein wirkungslose, ninhydrin-negative, im UV-Licht fluoreszierende Verbindung komplementiert wird.

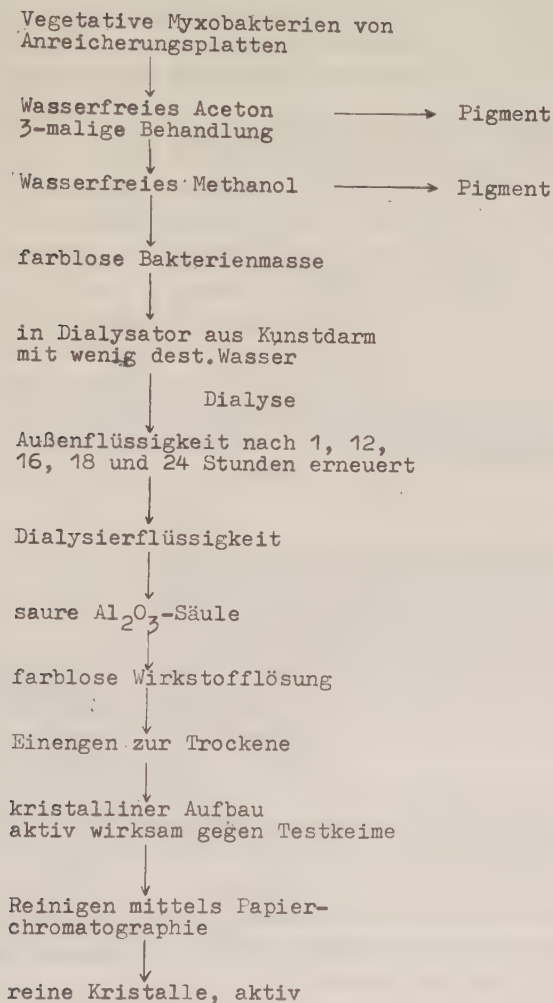
Zur Reindarstellung wurde immer wassergesättigtes Butanol als Fließmittel benutzt, in der Hauptsache deswegen, um einer eventuellen Schädigung und Beeinträchtigung der Antibiotikumsaktivität durch die Essigsäure vorzubeugen.

Zwei Arbeitspläne sollen den Gang der Isolierung und der Reindarstellung nach den beiden Verfahren verdeutlichen.

1. Arbeitsplan zur Isolierung des Wirkstoffes aus den vegetativen Keimen (Acetonverfahren)



2. Arbeitsplan zur Isolierung des Wirkstoffes aus vegetativen Keimen (Dialysemethode)



Neben diesen beschriebenen Versuchen wurde parallel eine eventuelle antibiotische Wirksamkeit bei Katalase-positiven und Katalase-negativen Stämmen, die im vegetativen Zustand keine Hemmwirkung gegen Testkeime entwickelten, untersucht.

Es wurden verschiedene Katalase-positive und Katalase-negative, nicht antibakteriell wirksame Stämme auf die gleiche Weise behandelt, wie es mit dem aktivem Antibiotikumsproduzenten geschah. Die anfallenden wässrigen Extrakte zeigten z.T. eine wesentlich stärkere Pigmentfärbung, im UV-Licht dagegen stets eine verminderte blaue Fluoreszenz, immer aber eine deutlich sichtbare grünliche Fluoreszenz. Wurden die Lösungen mit sau-rem Al_2O_3 behandelt, so konnte nie eine Kristallbildung nach Verdampfung des Wassers beobachtet werden. Auch die Prüfung auf eine Hemmwirkung gegen Staph. aureus im Lochtest verlief immer negativ.

4. Beschaffenheit des Antibiotikums

a) Physikalische Eigenschaften

Das Myxobakterien-Antibiotikum stellt ein farbloses, kristallines Pulver mit stark hygroskopischen Eigenschaften dar. Die Kristalle sind durchsichtig und von charakteristischer Gestalt.

Einen Schmelzpunkt hat das Antibiotikum nicht, da es sich oberhalb 120°C unter Hinterlassung einer schwarzen homogenen Masse zersetzt.

Der Wirkstoff ist ausschließlich gut wasserlöslich. In allen anderen organischen Solventien ist er in der Kälte wie in der Hitze unlöslich (Tabelle 5).

Seine ursprünglich vorhandene Pigmentkomponente ist dagegen löslich in Methanol, Äthanol, Aceton, Chloroform und Petroläther.

Beim Behandeln des Wirkstoffes mit verdünnten Säuren und Laugen zeigte sich, daß eine n/100 HCl den Wirkstoff inaktiviert, den gleichen Effekt hat eine n/1000 Lauge.

Gegen Hitzeeinwirkung ist eine Wirkstofflösung relativ stabil. Erhitzen im Dampftopf bei 100° C ergab folgende Werte:

Zeit	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Wirkstoff- verhalten im Lochtest ge- gen Staph. aureus	aktiv	aktiv	schwach aktiv	schwach aktiv	inaktiv

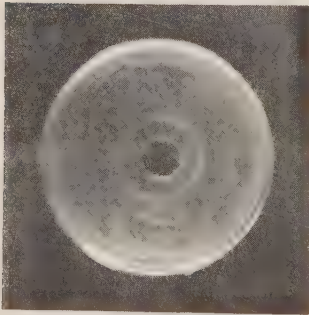
Sowohl die wässrigen Lösungen des Wirkstoffes als auch der kristalline feste Stoff waren im Kühlschrank bei -2° C längere Zeit haltbar. Eine Schwächung der Aktivität konnte erst nach 2 - 3-monatigem Verweilen bei dieser Temperatur festgestellt werden.

Im UV-Licht zeigt das Antibiotikum eine charakteristische blaue Fluoreszenz, die durch eine organische, synergistische Verbindung bedingt ist. Eine Verminderung oder Inaktivierung nach einer 6-stündigen Einwirkung der UV-Strahlung konnte nicht nachgewiesen werden.

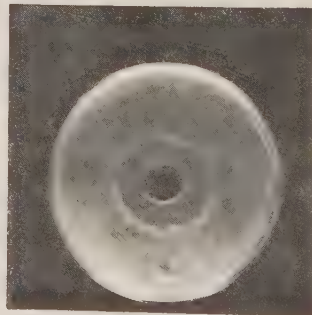
b) Chemische Eigenschaften

Zur Prüfung, ob es sich um eine reine Substanz handelte, wurde der gewonnene Wirkstoff unter Verwendung von wassergesättigtem Butanol als Laufmittel aufsteigend papierchromatographiert. Dabei ergab sich eine Auftrennung des Wirkstoffes in einen im UV-Licht blau fluoreszierenden Stoff mit einem R_f -Wert von 0,10 und in eine ninhydrin-positive Substanz, die einen R_f -Wert von 0,028 hatte (Abb. 13).

Bei dem Versuch, beide Stoffe getrennt zu eluieren, ergab sich, daß der fluoreszierende Stoff, nach Verdampfung des Wassers, kristallin auf dem Uhrglas zurückblieb, während der ninhydrin-positive Stoff nicht kristallin ausfiel. Wurden die Rückstände getrennt mit wenig dest. Wasser aufgenommen und im Lochtest gegen Staph. aureus getestet, so zeigte sich, daß der im UV-Licht fluoreszierende, kristallin ausfallende Stoff nicht aktiv war, während der ninhydrin-positive, nicht kristalline Stoff eine gute Wachstumshemmung aufwies, die aber nicht so stark war, als wenn beide Lösungen zu gleichen Teilen vermengt getestet wurden.



a

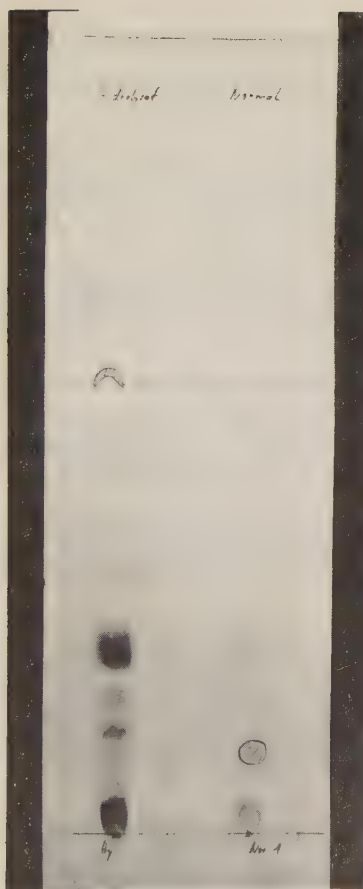


b

Abbildung 12:

- a) Hemmwirkung des reinen Wirkstoffes ohne die fluoreszierende organische Verbindung.
 - b) Hemmwirkung von Wirkstoff und organischer Verbindung zusammen.
- Beide Teste jeweils gegen Staph. aureus auf Moutonagar gleicher Schichthöhe (pro Nährbodenschale 15 ml Moutonagar).

Zur Feststellung, ob es sich bei dem beschriebenen Wirkstoff um einen einheitlich aufgebauten oder um einen zusammengesetz-



fluoreszierender
Stoff, keine Hemm-
wirkung

ninhydrin-positiver
Stoff, Hemmwirkung
gegen verschiedene
Testkeime

Abbildung 13:

Links auf dem Chromatogramm der hydrolysierte,
aufgetrennte Wirkstoff.

Rechts der unbehandelte nicht-hydrolysierte.
Die schraffierten Flecken geben die stark im
UV-Licht fluoreszierenden Stellen an (Lauf-
mittel: wassergesättigtes Butanol)

ten Körper handelte, wurde eine bestimmte Menge des noch fluoreszierenden, kristallinen Antibiotikums der Säurehydrolyse unterworfen.

Hydrolysiert wurde mit 6 n HCl in einem zugeschmolzenen Glasrohr bei 105° C während 24 Stunden. Anschließend wurde das Hydrolysat zur Trockene eingengt und mit 6 n NaOH neutralisiert, mit wenig dest. Wasser aufgenommen und der aufsteigenden Papierchromatographie mit wassergesättigtem Butanol als Transportmittel unterzogen.

Nach der Entwicklung des Chromatogramms mit Ninhydrin-Reagenz zeigten sich 5 ninhydrin-positive Flecken blau-rötlicher Färbung und ein im UV-Licht stark fluoreszierender Fleck im oberen Teil des Chromatogramms (Abb. 13).

Damit konnte bewiesen werden, daß am Aufbau des Myxobakterien-Wirkstoffes Aminosäuren polypeptidartiger Bindung beteiligt sind.

Das gewonnene Hydrolysat wurde in zahlreichen Versuchen mit Hilfe der Papierchromatographie auf seine Aminosäuren untersucht. Als Laufmittel diente vorwiegend Butanol-Wasser-Eisessig (9:1:1) und wassergesättigtes Butanol. Es wurde stets aufsteigend chromatographiert.

Der der Startlinie am nächsten liegende angefärbte Aminosäurefleck dürfte, durch Vergleichschromatographie mit bekannten Aminosäuren erwiesen, Lysin sein. Die drei dann schwächer angefärbten Flecken konnten mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Der oberste, wieder stark angefärbte Fleck ist sehr wahrscheinlich Tyrosin. Letzteres wird schon deshalb angenommen, weil der Wirkstoff eine positive Biurettprobe und eine positive Xanthoproteinprobe gibt, die charakteristisch sind für Aminosäuren mit aromatischen Ringen.

Das Pigment konnte in Form eines rötlich-braunen lipoidartigen Wachses isoliert werden, das unlöslich in Wasser, dafür aber gut löslich in Äther, Aceton, Chloroform und Methanol war. Eine antibiotische Wirkung auf das Wachstum von Testbakterien konnte in keinem Falle nachgewiesen werden, auch chromatographisch konnte es nicht weiter aufgetrennt werden.

Das Myxobakterien-Antibiotikum ist also ein Polypeptid aus 5 Aminosäuren, das verstärkte Hemmwirkung und kristallinen Aufbau zeigt, wenn es mit einer unbekannten im UV-Licht fluoreszierenden organischen Verbindung gekoppelt ist.

c) Biologische Eigenschaften

Sowohl das Rohantibiotikum mit seinen Verunreinigungen als auch der gereinigte Wirkstoff zeigen im Tierversuch keine toxischen Wirkungen.

Einer Reihe von Mäusen wurde das Antibiotikum konzentriert und in fallenden Konzentrationen intravenös in die Schwanzwurzel verabreicht. Je drei Mäuse wurden mit 2 ml der folgenden Wirkstoffverdünnung geimpft: 1/1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; 1/128; 1/256; 1/512; 1/1024 und 1/2048.

Die Ausgangslösung enthielt dabei 32 mg Wirkstoff pro ml physiologischer NaCl-Lösung.

Von den 36 Versuchstieren vertrugen 34 die Wirkstoffverabreichung reaktionslos. Nur 2 Tiere (Verdünnung 1/512 und 1/128) gingen während des Versuchs auf Grund eingetretener Krankheiten ein.

Dieser Versuch erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und genaue Erkennung toxikologischer Eigenschaften des Antibiotikums, vielmehr sollte orientierend die gute Verträglichkeit und die geringe toxikologische Wirkung aufgezeigt werden.

Ferner wurde die geringste Menge des Wirkstoffes ermittelt, die noch eine antibiotische Wirkung gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Testbakterien ergibt (minimale Hemmstoffkonzentration).

Verwendet wurde eine wässrige Standardlösung des Antibiotikums, die genau 2 mg/1 ml Wirkstoff enthielt. In Petrischalen, die mit genau 15 ml Moutonagar ausgegossen waren, wurde im Lochtest die verdünnteste Lösung ermittelt, die gerade noch eine Hemmwirkung des Bakterienwachstums erkennen läßt.

Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle 6.

Testkeime	Verdünnung	mg Wirkstoff/ml
Salmonella typhi murium	1/1	= 2.00 mg/ml
Aerobakter nov. spec.	1/1	= 2.00 mg/ml
Shigella flexneri	1/4	= 0.50 mg/ml
E. coli	1/8	= 0.25 mg/ml
B. cereus	1/64	= 0.03 mg/ml
Staph. aureus	1/512	= 0.035 mg/ml
Sarc. tetragena	1/1024	= 0.0017 mg/ml

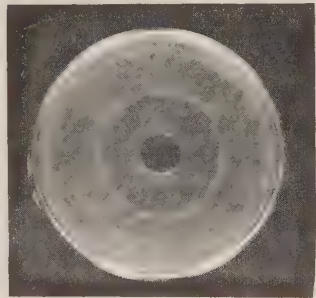
Der empfindlichste Keim gegen das Myxobakterien-Antibiotikum war Sarc. tetragena; der Keim wurde noch in einer Verdünnung von 1/1024 der Ausgangslösung im Wachstum gehemmt. Im allgemeinen zeigen aber 30 - 250 γ /ml eine gute Hemmwirkung des Wachstums gram-positiver und gram-negativer Keime.

Der gereinigte Wirkstoff zeigte eine stärkere Hemmwirkung als das Rohantibiotikum. Dies ist wohl im großen und ganzen durch eine bessere Wanderung desselben im Agar bedingt. Die Verunreinigungen ließen den aktiven Teil des Wirkstoffes nur sehr langsam und weniger weit in den Agar hineindiffundieren.

Das Rohantibiotikum ließ in dem von ihm erzeugten Hemmhof selten resistente Keime auftreten, während dies bei dem gereinigten Wirkstoff häufiger vorkam. Das war übrigens der Grund, weshalb die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen im Agar-diffusionstest und nicht in dem üblichen Röhrcchen-Verdünnungstest ermittelt worden war. Im Röhrcchen-Verdünnungstest zeigten selbst höhere Konzentrationen des kristallinen Antibiotikums nach einigen Stunden ein Wachstum der Testkeime, was auf die gehäufte und rasche Entstehung resistenter Varianten zurückzuführen war.



a



b

Abbildung 14:

- a) Der wässrige Myxobakterienwirkstoff-Rohextrakt im Lochtest gegen Staph. aureus getestet, zeigt kein Auftreten von resistenten Keimen und geringes Diffusionsvermögen.
- b) Der kristalline Wirkstoff dagegen zeigt ein größeres Diffusionsvermögen im Agar, aber auch das Auftreten von resistenten Keimen in der Hemmzone.

Auch in der Beständigkeit traten Unterschiede auf. Das Rohantibiotikum war beim Stehen im Kühlschrank weniger stabil als das gereinigte Produkt.

So trat beim wässrigen Rohantibiotikum nach einiger Zeit eine Verfärbung zum tiefen Braun auf und eine eintretende Trübung der Lösung führte bald zu einem Bodensatz. Auffallend dabei war, daß nie die Aktivität durch solche physikalischen und chemischen Reaktionen in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Um eine eventuelle lytische Einwirkung des wässrigen Wirkstoffkonzentrates festzustellen, wurden verschiedene Testkeime mit diesem zusammengebracht.

In eine stark wirksame wässrige Antibiotikumlösung (2 mg/ml) wurden in drei verschiedenen Reagenzgläsern verschiedene Keime eingebracht. Als Vergleich lief ein Röhrchen mit sterilem dest. Wasser für jede Charge mit.

Die Bakterien wurden 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 12 Stunden der Einwirkung des Antibiotikums überlassen und nach der jeweiligen Zeit mikroskopisch im Nativ- und im gefärbten Präparat auf eventuelle lytische Einwirkungen untersucht. Ergebnisse:

Tabelle 7

Zeit	Testkeime		
	Kokken	Stäbchen	Bacillen
1. Stunde			
2. "	keine Verän-	keine lyti-	nach der
3. "	derung der	schen Ein-	1. Std.
4. "	Zellwand wä-	wirkungen	Einsetzen
5. "	rend der ganzen	nachweisbar	der Sporo-
6. "	Einwirkungszeit		lation
12. "	erkennbar		

Wurden die Keime nach 12-stündiger Einwirkung von der Wirkstofflösung abzentrifugiert und anschließend dreimal gut mit sterilem dest. Wasser ausgewaschen und in eine Nährbouillon gebracht und 24 Stunden bei 37° C bebrütet, so konnte nur ein schnellauftretendes Wachstum bei dem Sporenbildner B. cereus nachgewiesen werden. Die anderen Keime (Staph. aureus und E. coli) zeigten zuerst kein Wachstum, nach dreitägiger Bebrütung war dann allerdings auch bei ihnen ein schwaches Wachstum zu verzeichnen.

Mikroskopisch konnte nirgends eine lytische Einwirkung nachgewiesen werden. Die Keime zeigten im Vergleich zu denen, die aus der wässrigen Vergleichslösung stammten, keinerlei Beschädigungen und Deformationen.

Es scheint sich also bei der Wachstumshemmung um eine Bakteriostase zu handeln. Eine Bakteriolyse konnte in jedem Falle ausgeschlossen werden, auch bakterizide Eigenschaften dürften dem Myxobakterien-Wirkstoff nicht zukommen.

Wurden vegetativ aktive Amöben (Amöba proteus) in das wässrige Wirkstoff-Konzentrat eingebracht, so setzte augenblicklich eine Enzystierung der Amöben ein. Nach einer einstündigen Einwirkung waren alle Amöben im Begriff, sich zu enzystieren. Dieser Prozeß war nach einigen Stunden abgeschlossen. Es lagen nur noch im mikroskopischen Bild sichtbar enzystierte Amöben vor.

Diese Befunde stehen völlig im Einklang mit dem Amöbenverhalten der antibakteriell wirksamen Stämme. Auch hier kam es in der Nähe von stark wirkstoffbildenden Myxobakterien-Stämmen nur zu einer sofortigen Enzystierung und ebenfalls niemals zur Lyse der ausgeimpften Amöben.

Wurden die Amöben abzentrifugiert und nach dreimaligem Waschen mit sterilem dest. Wasser auf Petriagarschalen überimpft, die mit einem monocytären Colirasen bedeckt waren, so befanden sie sich nach 36-stündiger Bebrütung in einem vegetativen fressenden Zustand.



Abbildung 15:

Die Abbildung zeigt die enzystierten Amöben nach dreistündiger Einwirkung des wässrigen Myxobakterien-Antibiotikums.

Das Wassermyxobakterien-Antibiotikum ist also nicht imstande, vegetative Amöben zu einer Lyse zu bringen. Trotzdem scheint es einen stoffwechselwidrigen bzw. vermehrungswidrigen Effekt auf diese zu besitzen.

5. Diskussion

Nachdem es gelungen ist, das antibiotische Prinzip der Wassermyxobakterien zu isolieren und seine chemische Zusammensetzung weitgehend aufzuklären, ist es notwendig, einen Vergleich mit den anderen, bisher bei Myxobakterien bekannt gewordenen antibiotischen Stoffen vorzunehmen und zu ermitteln, ob es sich bei den antibiotischen Stoffen der verschiedenen Myxobakterien um ähnliche oder vielleicht sogar um identische Substanzen handelt.

Ein Vergleich auf chemischer Basis stößt insofern auf Schwierigkeiten, da bei allen bisher beschriebenen Myxobakterien-

Wirkstoffen eine Isolierung und Reindarstellung nicht durchgeführt worden war. Eine gewisse Vergleichsmöglichkeit ergibt sich am ehesten mit den Rohextrakten, die Oxford und Singh aus Kulturen von Myxococcus virescens gewinnen konnten.

Die genannten Autoren verwendeten einen einfachen, flüssigen Nährboden, woraus sie nach 10-tägigem Wachstum ihres Myxobakterien-Stammes in nicht näher beschriebener Weise eine antibiotisch aktive Rohsubstanz gewinnen konnten. Über die chemische Beschaffenheit des Rohantibiotikums wird nichts ausgesagt, es geht jedoch aus der Arbeit hervor, daß die Substanz in einigen organischen Lösungsmitteln z.B. Alkohol löslich war und daß somit mit dem Wirkstoff der Wassermyxobakterien, der bekanntlich nur in Wasser löslich ist, keine Identität bestehen kann.

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit mit den antibiotischen Stoffen anderer Myxobakterien ist im Wirkungsspektrum gegeben.

Das aus den Wassermyxobakterien isolierte Antibiotikum zeigt sowohl gegen gram-positive als auch gegen eine Auswahl gram-negativer Bakterien wachstumshemmende Eigenschaften. Die Wirkung ist jedoch vorwiegend bakteriostatischer Natur, denn selbst bei längerer Einwirkung relativ hoher Wirkstoffkonzentrationen war nach sorgfältiger Entfernung des Wirkstoffes die Vermehrungsfähigkeit der getesteten Keime noch gering erhalten.

Fungistatische Eigenschaften waren selbst bei den stärksten Wirkstoffbildnern unter den Wassermyxobakterien-Stämmen niemals nachzuweisen.

Die Wirkung auf Protozoen war in Analogie zu den Bakterien wiederum nur protostatisch, aber nicht protozid, denn selbst bei hohen Wirkstoffkonzentrationen konnten die Amöben sich noch rasch einzystieren und waren nach Aufhören der Stoffeinwirkung wieder vollständig zu vegetativem Leben zu erwecken.

Überdies liegen die protostatistischen Konzentrationen bei weitem höher als die bakteriostatischen, so daß unter natürlichen Bedingungen die antibakteriellen Wirkungen der Myxobakterien im Vordergrund stehen dürften.

Vergleicht man diese Eigenschaften mit den leider nur spärlichen und lückenhaften Angaben der Literatur über andere Myxobakterien-Wirkstoffe, so findet sich wenig Übereinstimmung.

Die Angaben von G. Finck lassen schlecht einen Vergleich zu, da "Luftkokken, Kurzstäbchen und Sporenbildner", gegen die ihre Myxobakterien antibiotisch wirksam waren, bakteriologisch nicht ausreichend definiert sind. Allerdings weisen die von G. Finck nachgewiesenen fungistatischen Eigenschaften, die bei Wassermyxobakterien niemals festgestellt werden konnten, darauf hin, daß es sich um einen anderen Wirkstoff handeln muß.

Auch die Befunde von Oxford und Kato, die bei ihrem Antibiotikum eine rasch abnehmende Wirkung feststellen konnten, in dem Sinne, daß nach kurzer Wachstumszeit die antibakterielle Wirkung im Nährboden wieder weitgehend verschwand, lassen eine Identität mit dem stabilen Wassermyxobakterien-Antibiotikum ausschließen.

Unterzieht man unter diesen vergleichenden Gesichtspunkten die antibiotische Aktivität der Wassermyxobakterien einer zusammenfassenden Würdigung, so steht fest, daß ihr grundsätzlich anderes Biotop gegenüber den Bodenmyxobakterien auch einen anderen antibiotischen Wirkungsmechanismus bedingt.

Der bei den Bodenbakterien angenommene Synergismus von antibiotischen Wirkstoffen und lytischen Fermenten zum Zwecke der Nahrungsbeschaffung ist bei den Wassermyxobakterien kaum vorhanden, da lytische Fermente bei Spor. cauliformis niemals nachgewiesen werden konnten. Selbst bei innigem Kontakt der in eine Fremdkolonie eingeschwärzten Myxobakterien mit den fremden Bakterienzellen bleiben diese morphologisch unversehrt.

Die Antibiose dürfte bei den Wassermyxobakterien mehr den Zweck haben, eine Abschirmung des Lebensraumes gegenüber anderen Bakterien zu erreichen. Dafür spricht auch die Tatsache, daß gerade dann, wenn der Gesamtkeimgehalt eines Gewässers ansteigt, d.h. mit zunehmender Eutrophierung, ein Zunehmen der potentiellen Antibiotikabildner, d.h. der Typ II-Stämme auffällig ist (Gräf und Stürzenhofecker). Auch in den mit Keimen massiv beladenen Oberflächen von Kläranlagentropfkörpern sind die Verhältnisse ähnlich. Man findet dort wiederum ein starkes Überwiegen der Typ II-Stämme von Spor. cauliformis und somit auch eine Anreicherung von Antibiotikabildnern.

Die praktische Bedeutung der antibiotikumbildenden Wassermyxobakterien dürfte wohl in der Beteiligung bei der natürlichen Gewässerselbstreinigung zu sehen sein. Auch bei der biologischen Abwasserreinigung in sog. Tropfkörpern und ähnlichen Konstruktionen dürfte die keimwidrige Tätigkeit der Wassermyxobakterien von Bedeutung sein.

Für eine keimverminderte Wirksamkeit der Wassermyxobakterien in Oberflächengewässern und z.B. auch in Kläranlagentropfkörpern sprechen folgende Gesichtspunkte:

- 1.) Wassermyxobakterien sind als typische Wasserbewohner auf submersen Oberflächen leicht anzusiedeln.
- 2.) Das erzeugte Antibiotikum ist sehr gut und ausschließlich wasserlöslich.
- 3.) Es wirkt gegen gram-positive und gegen eine Reihe besonders wichtiger gram-negativer Keime.
- 4.) Protozoen werden nur in hoher Konzentration zur Enzystierung gebracht.

Somit scheinen sich die antibiotisch wirksamen Wassermyxobakterien gegenüber den Protozoen synergistisch zu verhalten, in dem Sinne, daß sie wasserfremde Keime antibiotisch schädigen

und damit ihre Phagozytose durch Protozoen erleichtern. Interessant ist, daß die gram-negativen Wasserbewohner wie Ps. fluoreszens nicht beeinträchtigt werden, während die mit fäkal-
ler Verunreinigung ins Oberflächengewässer gelangenden Keime wie E. coli, Salmonellen, Shigellen antibiotisch beeinflusst werden.

III. Zusammenfassung

Es wird über das Auffinden, die wirksame Aktivität gegen verschiedene Mikroorganismen und die Isolierung in kristalliner Form eines neuen Myxobakterien-Antibiotikums berichtet.

Von den 317 untersuchten Myxobakterien-Stämmen gehörten 73 Stämme dem Typ II an, die restlichen 244 Stämme dem Typ I.

Von den 73 Typ II-Stämmen zeigten 39, das sind 53,4 %, antibakterielle Eigenschaften, während Typ I-Stämme grundsätzlich keine antibakterielle Wirkung zeigten.

Die Wachstumshemmung ist sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien gerichtet.

Eine protostatische Wirkung, die unabhängig von der antibakteriellen ist, konnte sowohl bei Typ I-Stämmen als auch bei Typ II-Stämmen aufgefunden werden.

Das Antibiotikum stellt ein polypeptid aus 5 Aminosäuren dar, das noch mit einer unbekannten organischen Verbindung, die im UV-Licht stark blau fluoresziert, gekoppelt ist.

Auffallend ist, daß das Antibiotikum nur löslich in Wasser ist und selbst von den gängigsten organischen Solventien nicht in Lösung gebracht werden konnte. Die geringste Hemmwirkung ist mit 3 γ /ml festgestellt worden, im Durchschnitt erzielen aber 30 bis 250 γ /ml eine gute Wachstumshemmung bei verschiedenen gram-positiven und gram-negativen Testkeimen.

IV. Schrifttum

- Anderson, R.L. u. E.J. Ordal : J. Bact. 81 (1961) 130
Anscombe, F.J. u. B.N. Singh : Nature 161 (1948) 140
Bachmann, B.J. : J. Gen. Microbiol. 13 (1955) 541
Baur, E. : Arch. Protistenkde. 5 (1904)
Beebe, J.M. : J. Bact. 42 (1941 b) 193
Bender, H. : Arch. Mikrobiol. 43 (1962) 262
-ders., ebda.: 45 (1963) 407
Finck, G. : Arch. Mikrobiol. 15 (1950) 358
Geitler, L. : Arch. Protistenkde. 50 (1925) 67
Gräf, W. : Arch. Hyg. 145 (1961) 405
-ders. : Arch. Hyg. 146 (1962) 114
Gräf, W. u. F. Stürzenhofecker : Arch. Hyg. 148 (1964) 79
Gräf, W. u. K. Klinge : Zbl. Bakteriell. Parasitenk. und Hyg.
I Orig. 174 (1959) 243
Humm, H.J.: Bull. Duke Univ. Mar. Sta. 3 (1946) 43
Imschenetzki, A.A., u. L.A. Kusjurina: Microbiologija 20 (1951) 3
Jahn, E.: Beiträge zur bot. Protistologie, Leipzig 1924
Kadota, H.: Mem. Coll. Agric. Kyoto, No. 74 (Fish. Ser. No. 6) 1956, 1
Kato, H. : Ecol. Rev. (Japan) 14 (1955) 25
Katzenberger, I., H. Kühlwein, u. G.A. Kausche: Zbl. Bakt., Parasitenk., Infektionskr. u. Hyg. Abt. II 109 (1956) 78
Katzenberger, I. u. G.A. Kausche: Naturwiss. 44 (1957) 44
Kühlwein, H. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 162 (1955) 296
-ders. : Zbl. Bakt.-Abt. II 113 (1960) 480
Norén, B. Svensk. Bot. Tidskr. 44 (1952) 108
-ders.: ebda. 47 (1953) 402
-ders.: ebda. 49 (1955) 282
-ders.: ebda. 54 (1960) 550
-ders.: Botan. Notiser 113 (1960b) 320
Oetker, H.: Arch. Mikrobiol. 19 (1953) 206
Ordal, E.J. u. J.J. Rucker: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 56 (1944) 15
Oxford, A.E.: J. Bact. 53 (1947) 129
Oxford, A.E. u. B.N. Singh: Nature 158 (1946) 745

- Pinoy, M.E.: C.R. Acad. Sci. (Paris) 157 (1913) 77
-ders.: Ann. Inst. Pasteur 35 (1921) 487
Singh, B.N. : J. Gen. Microbiol. 1 (1947) 1
Sniesko, S.F., Mc.Allister u. Hitchner: J.Bact. 41 (1941) 26
Solntzewa, L.J. Microbiol. (Moskau) 8 (1939) 700
Starr, T.J. u. E.J. Ordal: Tech.Rep. No. 14 (1953) Office
of Naval Research, USA
Thaxter, R. Botan. Gaz. 17 (1892) 389
-ders.: ebda. 18 (1893) 29
Velankar, N.K.: Indian J. Fish. 4 (1957) 208

Lebenslauf

Als Sohn des damaligen Direktors Felix Sukatsch und seiner Frau Luz geb. Grehl wurde ich, Dieter Andreas Sukatsch am 11. Mai 1935 zu Gleiwitz geboren. Ein Jahr nach dem Tode meines Vaters wurde ich im September 1941 in die Oberbürgermeister-Brüning-Schule zu Beuthen eingeschult, die ich bis Dezember 1944 besuchte. Infolge der Kriegseignisse verließen meine Mutter und ich Beuthen im Januar 1945. Erst 1948 konnte ich in Norddeutschland meine Schulausbildung wieder aufnehmen. Nach bestandener Aufnahmeprüfung war ich ab April 1950 Schüler des Realgymnasiums in Diepholz. Im Frühjahr 1952 trat ich in das Gerhard-Rohlf's-Gymnasium in Bremen-Nord über. Ab April 1956 besuchte ich das Gymnasium an der Dechanatstraße zu Bremen, wo ich im Februar 1958 mein Abitur ablegte. Im SS 1958 begann ich das Studium der Naturwissenschaften an der Westfälischen-Wilhelms-Universität, das ich ab WS 1958/59 in Erlangen an der Friedrich-Alexander-Universität fortsetzte.

Fotodruck

– W. Hög, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Röthelheimbad) Telefon 1636 [15336] –